380104-A

この説明書をよく読んでから使用してください。
本製品は、研究用試薬です。診断目的には使用しないでください。

研究用

2010年11月作成（第1版）

Loopamp
LAMP（Loop-mediated Isothermal Amplification）法

# 単純ヘルペスウイルス（HSV-1/2）検出試薬キット

Herpes Simplex Virus（HSV-1/2）Detection Kit

## 【特徴】

LAMP（Loop－mediated Isothermal Amplification）法は、①1種類の酵素のみを使用して遺伝子増幅反応が等温で進行する[1),2)]、②6領域を認識する4種類のプライマーを使用するため特異性が高い、③増幅効率が高く、短時間に増幅が可能である、④増幅産物が多く、簡易検出に適している[3),4)]、等の特徴を有する遺伝子増幅法です。

本製品は、単純ヘルペスウイルス1型及び2型（Herpes Simplex Virus type1/2；HSV-1/2）の遺伝子を検出する[5)]試薬です。予め反応チューブの蓋に、検出試薬（プライマーミックスとDNA合成酵素を含む）が乾燥・保持されているため、マスターミックスの調製は不要です。鋳型DNAを含むサンプル溶液で検出試薬を溶解し、その試薬を65℃に40分間保つだけで鋳型DNAから核酸を増幅することができます。

反応原理の詳細については、Eiken GENOME SITE（URL；http://loopamp.eiken.co.jp/）を参照してください。

## 【内容】

48テスト分

| | | |
|---|---|---|
| （1） | HSV-1 Detection Reagent ※1 | 8-strip tubes × 6 |
| （2） | HSV-2 Detection Reagent ※2 | 8-strip tubes × 6 |
| （3） | Positive Control HSV-1（PC HS1）※3 | 0.5 mL × 1 |
| （4） | Positive Control HSV-2（PC HS2）※3 | 0.5 mL × 1 |
| （5） | Negative Control HSV（NC HSV）※3 | 1.0 mL × 1 |

※1：HSV-1 Detection Reagentは乾燥試薬が青色です。
※2：HSV-2 Detection Reagentは乾燥試薬が赤色です。
※3：（ ）内の表示は、試薬チューブに記載されている表示です。

## 【使用方法】

### 1．必要な器具・装置・試薬

（本製品には含まれていませんので別途用意してください。）

○ DNA抽出キット（QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN）
○ ピペット（10～100μL）
○ フィルター付きピペットチップ（RNase、DNaseフリー）
○ 反応チューブ用ラック
○ 微量簡易遠心機
○ 8連マイクロチューブ用簡易遠心機
○ リアルタイム濁度測定装置（LAMP法専用）

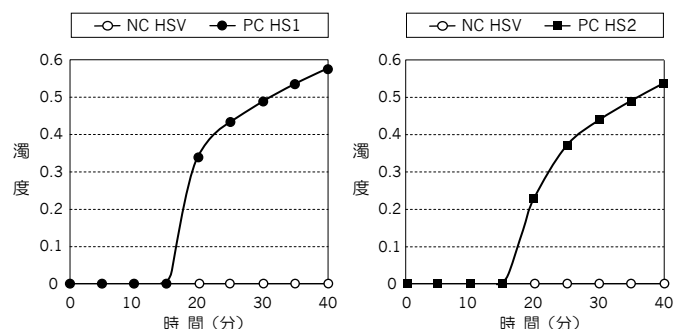
### 2．サンプル溶液

採取した子宮頸管及び外陰部の拭い液からDNAを抽出する際には、QIAamp DNA Mini Kit（QIAGEN社）を使用し、付属の使用説明書に記載された使用方法に従ってください。

### 3．操作方法

1）検出試薬等を冷蔵（1～10℃）で保存している場合は、アルミパックを開封する前に5分間室内温度に放置してください。HSV-1 Detection Reagent及びHSV-2 Detection Reagentの反応チューブをアルミパックから必要本数（検体数＋2）取り出します。また、反応チューブを切断する場合は、引きちぎる等の方法で切断せず、乾燥試薬に衝撃を与えないようはさみで切断してください。残りの反応チューブは、直ちに元のアルミパックで密封して保存します。
2）ピペットを用いて反応チューブに、Negative Control HSV（NC HSV）を30μL添加し蓋を閉めます。
3）ピペットを用いて反応チューブに、サンプル溶液を30μL添加し蓋を閉めます。
4）ピペットを用いて反応チューブに、HSV-1 Detection Reagent使用時にはPositive Control HSV-1（PC HS1）を、HSV-2 Detection Reagent使用時にはPositive Control HSV-2（PC HS2）を30μL添加して蓋を閉めます。
5）反応チューブを転倒して溶液を蓋に移し、転倒した状態のまま室内温度で3分間放置します。5分間を超えて放置した試薬では、正しく測定されないおそれがありますので、試薬を再度調製してください。
6）反応チューブを5回転倒混和します。この際、蓋の検出試薬が十分溶解され、溶解液が青色又は赤色を呈したことを確認してください。
7）8連マイクロチューブ用簡易遠心機でスピンダウンします。

### 4．増幅反応及び判定

1）調製の終了した反応チューブをリアルタイム濁度測定装置にセットし測定（65℃, 40分間）を開始します。増幅反応終了後は、酵素失活操作（80℃, 5分間 又は95℃, 2分間）を行ってください（RT-160C、LA-320C及びLoopamp EXIAでは自動処理されます）。
2）リアルタイム濁度測定装置の表示画面上で、Positive Control HSV-1（PC HS1）、Positive Control HSV-2（PC HS2）とNegative Control HSV（NC HSV）の濁度変化を確認します。Positive Control HSV-1（PC HS1）とPositive Control HSV-2（PC HS2）は濁度が上昇し、Negative Control HSV（NC HSV）では濁度に変化がない場合、増幅反応は正常に進行しています（下図参照）。
3）各検体の判定を行います。Positive Control HSV-1（PC HS1）やPositive Control HSV-2（PC HS2）と同様に濁度の上昇が認められた場合は「陽性」です。Negative Control HSV（NC HSV）と同様に濁度に変化がない場合は「陰性」です。
検体によっては、濁度の上昇開始時間や上昇値が、Positive Control HSV-1（PC HS1）やPositive Control HSV-2（PC HS2）と異なる場合があります。

左図：HSV-1 Detection Reagentで測定したPositive Control HSV-1（PC HS1）とNegative Control HSV（NC HSV）の増幅曲線パターン※4

右図：HSV-2 Detection Reagentで測定したPositive Control HSV-2（PC HS2）とNegative Control HSV（NC HSV）の増幅曲線パターン※4

※4：本試薬の濁度の立ち上がり時間と初期鋳型量の間に相関関係はありません。

## 【使用上又は取扱い上の注意】

### 1．一般的な注意

1）LAMP 反応は非常に鋭敏な反応であり、鋳型 DNA や増幅産物が極微量でも混入すると誤った結果をもたらす原因となるおそれがあります。このようなコンタミネーションを回避するために、可能な限りサンプルの調製と試薬の調製は、別々のクリーンベンチ等を使用して行ってください。

2）DNA 分解酵素（DNase）の混入を避けてください。DNA は DNase により容易に分解されます。DNase は材料である検体や組織等、実験器具、試薬、水、更には実験者自身の唾液や汗からも混入するおそれがあります。

3）検体は感染の危険があるものとして、その検体採取・取扱いについては必要なバイオハザード対策[6]を取ってください。

4）本製品は、学術研究目的のみにご使用ください。

5）本製品の使用にあたっては遺伝子の知識、経験を有した技術者の指導のもとで実施してください。

6）本製品の性能に由来しない事由（操作方法を誤った場合等）による誤った結果、判定、またはその判定に由来して発生した事項に対して、当社は一切の責任を負いません。

7）リアルタイム濁度測定装置を使用する場合、添付文書や使用説明書、取扱説明書等をよく読んでから使用してください。

### 2．試薬の取扱い

1）本製品は指定の貯蔵方法で保存してください。凍結保存は品質維持のため避けてください。

2）余った反応チューブは直ちに元のアルミパックに戻し、密封して指定の貯蔵方法で保存してください。

3）反応チューブは破損しやすいので、取扱いには注意してください。

4）反応チューブは使用する前に、キズ・ヒビ等が無いことを目視で確認してください。反応チューブにヒビ・キズ等があると正しく測定できないばかりか、チューブの破損により装置を汚染する可能性があります。リアルタイム濁度測定装置のブロック内でチューブが破損した場合は、反応液が装置本体に漏出し、除去不能な汚染や故障の原因となります。

5）反応チューブの蓋（リブの内側）に検出試薬が乾燥・保持されていますので、蓋に過度の衝撃を加えないように注意してください。また、蓋の内側を直接手で触らないように注意してください。

6）コンタミネーションを避けるため、開封後の反応チューブは陽性コントロール及び陽性が否定されていない検体とは離れた場所で保管してください。

7）使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。

### 3．操作方法の留意点

1）検出試薬の溶解は確実に行ってください。溶解が不十分な場合、感度が低下する等十分な性能が得られないことがあります。

2）サンプルには、子宮頚管若しくは外陰部を拭った綿棒を精製水に懸濁したものを使用し、凍結融解を繰り返した懸濁液の使用は避けてください。

3）サンプル溶液を混和後、反応液に気泡が残っていると濁度判定の支障となり誤判定の原因となります。気泡が生じないように注意してください。気泡が生じてしまった場合は、スピンダウンを行う等気泡を取り除いてください。

4）リアルタイム濁度装置は測定時高温となっております。火傷等に十分注意してください。

5）反応後のチューブを装置から取り出すときにチューブの蓋が開かないよう、慎重に取り出してください。増幅産物によるコンタミネーションは誤判定の原因となるばかりでなく、測定環境そのものを汚染し、汚染を完全に除去しない限り、以後正しい結果が得られなくなる可能性があります。

### 4．廃棄上の注意

1）反応後のチューブは蓋を開けずに、焼却処理又は密閉できるビニール袋を二重に施し、廃棄の基準に従って処理してください。増幅産物の飛散防止のため、廃棄の際にオートクレーブ処理は行わないでください。

2）チューブはポリプロピレン（ＰＰ）、チューブ蓋はポリエチレン（ＰＥ）、チューブ用トレイはＰＥＴ、アルミパックはアルミ、ケースは紙を主な材質としています。

3）使用後の試薬や容器及び器具類は、医療廃棄物等に関する規定及び、水質汚濁防止法等の各種規制に従い、各施設の責任において処理してください。

## 【包装単位・貯蔵方法・有効期間・製品コード】

| 製　品　名 | 包装単位 | 貯蔵方法 | 有効期間 | 製品コード |
|---|---|---|---|---|
| 単純ヘルペスウイルス（HSV-1/2）検出試薬キット | 48テスト分 | 1～30℃ | 1年間 | LMP531 |

## 【参考文献】


1）Notomi T., et al.: Nucleic Acids Research **28**, No.**12**, e63（2000）

2）Nagamine K., et al.: Clin. Chem. **47**, No.**9**, 1742–1743（2001）

3）Mori Y., et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. **289**, No.**1**, 150–154（2001）

4）Tomita N., et al.: Nat. Protoc. **3**, No.**5**, 877–882（2008）

5）東出 誠司, 他：日本性感染症学会誌 Vol.**12**, No.**1**, 120–127（2010）

6）日本細菌学会バイオセイフティー委員会：日本細菌学会誌, **54**, No.**3**, 667–715（1999）


## 【問い合わせ先】


栄研化学株式会社　お客様相談窓口

フリーダイヤル ®0120–308–421

製造販売元　栄研化学株式会社
栃木県下都賀郡野木町野木143番地




380104–A